

使用全二维液相色谱对不同类型的啤酒进行指纹图谱分析

Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案

应用简报

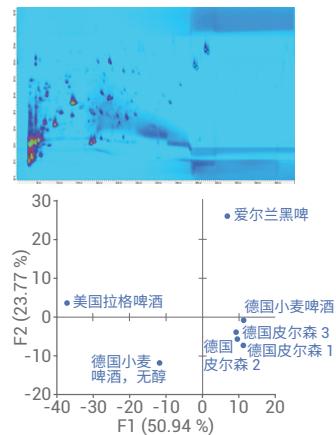
食品检测与农业

作者

Sonja Krieger
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

啤酒是一种成分非常复杂的酒精饮料，以水、大麦芽或小麦芽为主要原料，并添加啤酒花酿造而成。啤酒花中的 α -酸在麦汁煮沸的过程中形成异- α -酸，异- α -酸是啤酒典型苦味的主要来源。本应用简报展示了使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案对不同类型的啤酒进行全二维液相色谱分析。分别在第一维碱性与第二维酸性 pH 值条件下使用 C18 色谱柱获得了良好的正交性。通过与标准物质进行对比分析及质谱检测，鉴定出啤酒中的苦味化合物。非靶向多样品分析（指纹图谱分析）能够对所分析的不同啤酒类型进行分类。



Agilent Technologies

前言

啤酒是由淀粉糖化，再经淀粉水解糖发酵酿造而成的一种酒精饮料。其主要原料是水、大麦芽或小麦芽以及啤酒花^{1,2}。啤酒加工阶段包括麦芽制造、酿造、发酵与成熟。啤酒中含有超过 800 种有机化合物，其成分非常复杂。不同啤酒之所以风味各异，主要是由于水中矿物质含量、原料类型以及酿造方法不同。啤酒有两种典型的发酵方式：顶部发酵（如爱尔啤酒与德国小麦啤酒）与底部发酵（如拉格啤酒与德国皮尔森啤酒）¹。

在麦汁煮沸过程中添加啤酒花 (*Humulus lupulus L.*) 穗、啤酒花颗粒或其提取物获得啤酒苦味。啤酒花中含有 α -酸（葎草酮）与 β -酸（蛇麻酮），它们主要以 *n*-、*co*- 和 *ad*-同系物形式存在。在麦汁煮沸过程中，几乎无味的啤酒花 α -酸转换成异- α -酸（异葎草酮），后者赋予了典型的啤酒苦味与啤酒泡沫稳定性。异- α -酸具有光敏性，光照会导致异味的形成（日光嗅）³⁻⁵。因此，还原的异- α -酸（例如四氢异- α -酸）用于酿造业以提高啤酒的光稳定性与泡沫稳定性。德国啤酒纯净法禁止添加还原的异- α -酸，该法规定只能使用天然酒花化合物⁴。

使用配备紫外 (UV) 或质谱 (MS) 检测的高效液相色谱 (HPLC) 可对啤酒花产品中的 α -酸与 β -酸以及啤酒中的异- α -酸与还原的异- α -酸进行分析³⁻⁵。之前的应用简报介绍了对异- α -酸和还原的异- α -酸进行定量分析⁶。

除 α -酸与 β -酸之外，啤酒花中还有多种多酚化合物，其中某些多酚化合物增添了典型的啤酒苦味。最重要的多酚化合物是黄腐酚相关的异戊二烯类黄酮，例如黄腐酚、异黄腐酚与去甲基黄腐酚^{3,5}。

图 1 展示了异- α -酸与还原的异- α -酸，以及黄腐酚相关的异戊二烯类黄酮的结构。

由于啤酒成分非常复杂，而全二维液相色谱（全 2D-LC）因其固有的高峰容量，非常适用于对啤酒进行全面分析。本应用简报展示了通过对不同类型啤酒进行指纹图谱分析，进而可以对所分析的啤酒样品进行分类。

实验部分

设备

安捷伦 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案包括以下模块：

- 两个 Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)，配有 Agilent 1290 Infinity 恒温器 (G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，带 2 位/4 通双向阀（二维液相色谱阀头，1200 bar (部件号 5067-4214)，配备两个 60 μ L 定量环）
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)，配备 60 mm 最大光强卡套式流通池 (G4212-60007)

使用配备安捷伦喷射流电喷雾离子源 (G1958-65538) 的 Agilent 6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS 系统进行质谱检测。

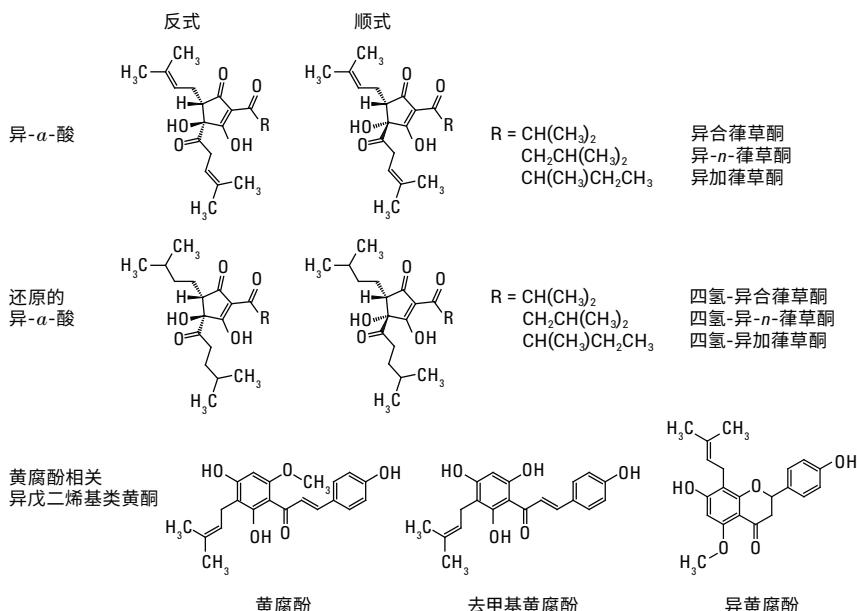


图 1. 异- α -酸、还原的异- α -酸与黄腐酚相关的异戊二烯类黄酮的结构

软件

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版, 版本 C.01.06 [61] 以及 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱采集软件, 产品版本 A.01.01 [26]
- Agilent MassHunter 工作站软件, 用于 Agilent 6200 系列 TOF/6500 系列 Q-TOF 的 LC/MS 数据采集, 版本 B.05.01, 定性分析版本 B.06.00
- 用于二维液相色谱数据分析的 GC Image LCxLC-HRMS 版软件来自 GC Image LLC., Lincoln, NE, USA

色谱柱

第一维

Agilent ZORBAX Extend-C18 窄径 RR 柱, 2.1×100 mm, $3.5 \mu\text{m}$ (部件号 761753-902)

第二维

Agilent Poroshell HPH-C18, 4.6×50 mm, $2.7 \mu\text{m}$ (部件号 699975-702)

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。乙腈和乙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 $0.22 \mu\text{m}$ 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。DCHA-ISO、ICS-I3 (由反式-异- α -酸的二环己胺盐纯化制备) 与 Tetra ICS-T2 (由同时含有顺式与反式异构体的四氢异- α -酸纯化制备) 均购自 Labor Veritas AG (Zurich, Switzerland)。乙酸铵购自 Sigma-

Aldrich (Steinheim, Germany), 氨水购自 Merck (Darmstadt, Germany)。甲酸来自安捷伦 (部件号 G2453-85060)。

优级再生纤维素膜过滤器的 1 mL 塑料注射器 (15 mm , $0.45 \mu\text{m}$ (部件号 5190-5109)) 对样品进行过滤。

第一维与第二维梯度如图 2 所示。

柱温箱

- 第一维色谱柱在右侧, 柱温 25°C
- 第二维色谱柱在左侧, 柱温 30°C

全二维液相色谱方法

第一维泵

溶剂 A 5 mmol/L 乙酸铵水溶液, 使用氨水调节 pH 至 9.95

溶剂 B 乙腈/乙醇 (60/40; v/v)

流速 0.075 mL/min

梯度
0 分钟 – B 为 2%
10 分钟 – B 为 2%
40 分钟 – B 为 40%
60 分钟 – B 为 50%
61 分钟 – B 为 95%
70 分钟 – B 为 95%

停止时间 70 分钟

后运行时间 15 分钟

第二维泵

溶剂 A 水 + 0.25% 甲酸

溶剂 B 乙腈 + 0.25% 甲酸

流速 4.0 mL/min

梯度与
梯度调制
0.00 分钟, B 为 5%; 20 分钟, B 为 5%; 43 分钟, B 为 30%; 44 分钟, B 为 70%; 49 分钟, B 为 70%; 50 分钟, B 为 55%
0.24 分钟, B 为 40%; 20 分钟, B 为 40%; 43 分钟, B 为 85%; 44 分钟, B 为 92%
0.25 分钟, B 为 5%; 20 分钟, B 为 5%; 43 分钟, B 为 30%; 44 分钟, B 为 70%; 49 分钟, B 为 70%; 50 分钟, B 为 55%
0.35 分钟, B 为 5%; 20 分钟, B 为 5%; 43 分钟, B 为 30%; 44 分钟, B 为 70%; 49 分钟, B 为 70%; 50 分钟, B 为 55%

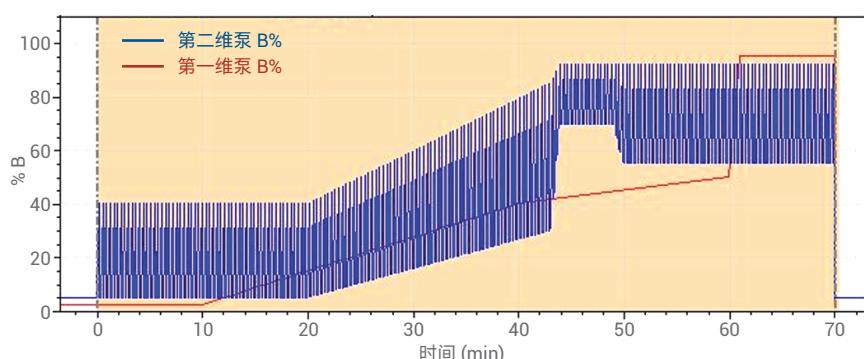


图 2. 第一维梯度与第二维梯度

2 位/4 通双向阀

每次第二维调制周期（21 秒）结束后，2 位/4 通双向阀自动切换。定量环采用并流方式（定量环以相同的流向进行填充与洗脱）。

自动进样器

进样量	10 μ L
样品温度	6 °C
进样针清洗	使用甲醇清洗 6 s

二极管阵列检测器

进行检测之前，利用 T 形三通将第二维色谱柱的流出物按大约 7:1 的比例分流到 DAD 与 MS。使用内径为 0.075 mm 的毛细管（长 340 mm）连接 T 形三通与 MS。

波长	270 nm/4 nm, 参比波长 395 nm/10 nm
数据采集速率	80 Hz

质谱仪

6530 精确质量数 Q-TOF LC/MS 系统在负离子模式下运行，采集速率为 10 谱图/秒，并满足下面的喷射流电喷雾源条件。

气体温度	300 °C
气体流速	9 L/min
雾化器	50 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
毛细管电压	-3000 V
喷嘴	-1000 V

结果与讨论

本研究开发了一种全二维液相色谱方法，用于对不同类型的啤酒进行指纹图谱分析。如上所述，第一维分离在碱性 pH 条件下使用 Agilent ZORBAX Extend-C18 色谱柱，对啤酒中异- α -酸与还原的异- α -酸进行分析⁴。由于

第一维和第二维分离的 pH 值不同，在第二维酸性 pH 条件下使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱获得选择性差异，因此提高了正交性。因为每一个调制周期下第一维碱性流出物都会进入到第二维色谱柱，所以在第二维中需要使用能在碱性条件下保持稳定的色谱柱。

使用所开发的全二维液相色谱方法，对七个啤酒样品（三个不同的德国皮尔森啤酒样品、一个德国小麦啤酒样品、一个德国无醇小麦啤酒样品、一个爱尔兰黑啤样品与一个美国拉格啤

酒样品）进行三次重复分析。图 3 展示了一种德国小麦啤酒、一种德国皮尔森啤酒以及一种美国拉格啤酒在 UV 检测波长为 270 nm 条件下分析获得的色谱图。结果表明，使用 C18 色谱柱分别在第一维碱性与第二维酸性 pH 值条件下实现了二维分离空间的良好覆盖性。此外，可观察到这三种不同类型啤酒的峰型差异（指纹图谱）。

在图 3 中，已标记出异- α -酸峰与还原的异- α -酸峰。根据标样的对比分析（分析了反式-异- α -酸混合物和还

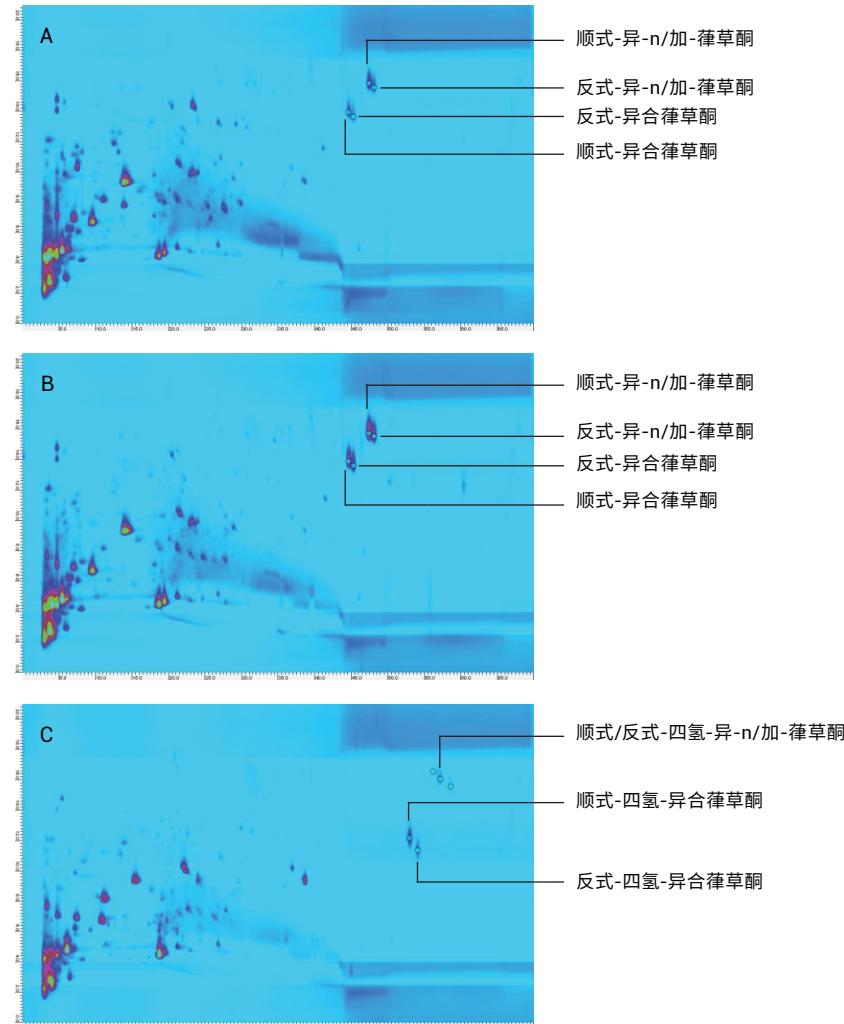


图 3. 不同类型的啤酒在 UV 检测波长为 270 nm 下获得的色谱图；A) 德国小麦啤酒；B) 德国皮尔森啤酒；C) 美国拉格啤酒

原的顺式-与反式-异- α -酸混合物)与 MS 检测进行鉴定。图 4 展示了通过对还原的顺式-与反式-异- α -酸的标准混合物 (A) 和美国拉格啤酒 (B) 进行分析所获得的顺式-四氢-异合葎草酮峰的质谱图。可以看出质谱图非常相似, $[M-H]^-$ 峰显示标样与美国拉格啤酒的质量数差异分别为 0.9 ppm 与 0.6 ppm。

所分析的德国啤酒与爱尔兰黑啤均含异- α -酸, 但不含还原的异- α -酸, 与根据德国啤酒纯净法 (只能使用天然啤酒花化合物进行酿造) 所预料的结果一样。相反, 所分析的美国拉格啤酒含还原的异- α -酸, 但并未检测出异- α -酸。

要对不同样品进行对比与分类, 可使用之前的应用简报⁷ 介绍的 LCxLC 软件进行非靶向多样品分析, 对比各个样品中的每种成分。进行上述非靶向多样品分析, 需要良好的保留时间重现性与峰容量, 而这正是 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案能提供的⁸。

使用配备 UV 检测的全二维液相色谱在检测波长 270 nm 条件下分析不同类型啤酒, 所获得的色谱图用于进行对比分析与分类。使用 LCxLC 软件对每个色谱图进行基线校正与峰检测预处理后, 再使用 Image Investigator 软件 (LCxLC 软件的一部分) 进行交叉样品特征匹配。在此

过程中, 将所有色谱图对齐, 生成一张复合色谱图。该复合色谱图中含有所有色谱图的所有峰, 用于确定峰区特征 (特征区域)。计算每个色谱图所确定的每个特征区域的响应百分比。利用特征区域各自的响应百分比, 对所分析的不同啤酒类型进行对比与分类。

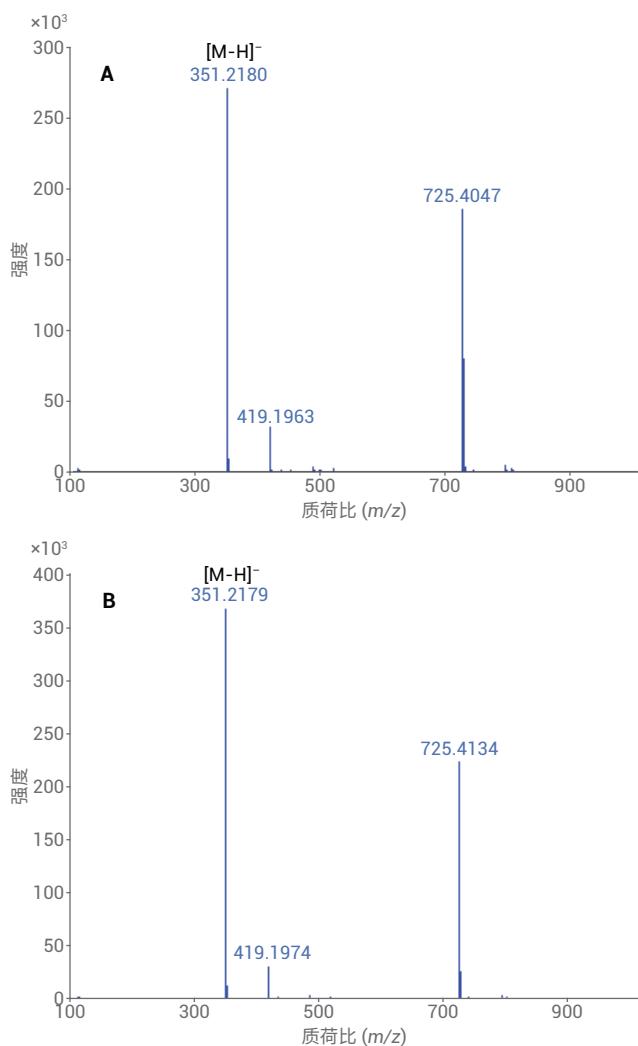


图 4. 通过对还原的顺式-与反式-异- α -酸的标准混合物 (A) 和美国拉格啤酒 (B) 进行分析获得的顺式-四氢-异合葎草酮峰的质谱图

通过主成分分析 (PCA) 对所分析的啤酒样品进行分类。因此，需要对所分析的三个重复样品的每一个样品计算每个特征区域的平均响应百分比。使用 PCA 可根据啤酒类型对啤酒样品进行分类，如图 5 所示。大约 88% 的数据差异性可通过前三个主成分 (F1–F3) 展现。使用 F1 和 F2 可使美国拉格啤酒、爱尔兰黑啤与无醇小麦啤酒相互间完全分离，并与包含三种皮尔森啤酒的组与德国小麦啤酒完全分离。F3 可进一步将德国小麦啤酒与三种皮尔森啤酒分离，这几种啤酒在同一组中非常靠近。

结论

本应用简报展示了使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案对不同类型的啤酒进行全二维液相色谱分析。分别在第一维碱性与第二维酸性 pH 值条件下使用 C18 色谱柱，可获得良好的正交性。根据标样的对比分析与 MS 检测，对啤酒苦味化合物（异- α -酸与还原的异- α -酸）进行鉴定。使用 LCxLC 软件进行非靶向多样品分析，随后进行主成分分析，可对所分析的不同类型啤酒进行分类。

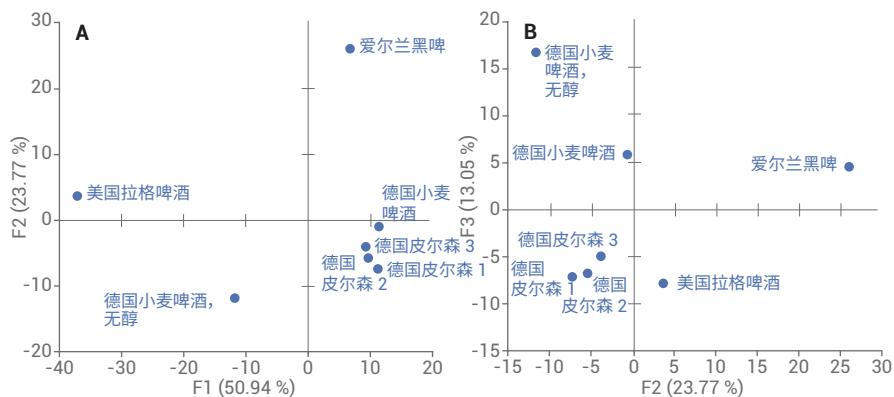


图 5. 七个不同啤酒样品的主成分分析。前三个主成分 (F1–F3) 展现了大约 88% 的数据差异性

参考文献

1. Araujo, A. S; et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. *Analyst* **2005**, *130*, pp 884-889
2. Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Beer> (accessed October 15, 2014)
3. Intelmann, D; et al. LC-MS/MS Quantitation of Hop-Derived Bitter Compounds in Beer Using the ECHO Technique. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, pp 1172-1182
4. Vanhoenacker, G; et al. Analysis of iso-alpha-acids and reduced iso-alpha-acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1035*, pp 53-61
5. Ceslova, L.; et al. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, pp 7249-7257
6. S. Schneider, Onsite Quality Control of Beer (啤酒现场质量控制)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-3474EN, **2013**
7. S. E. Reichenbach, E. Naegele, 2-Dimensional separation of polyphenols in beverages using the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution and software-assisted 2D-LC data analysis for comparison of ingredients (使用 Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案和软件辅助二维液相色谱数据分析对饮料中多酚类物质进行二维分离并用于成分对比)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-1455EN, **2013**
8. E. Naegele, Performance evaluation of the Agilent 1290 Infinity 2D-LC Solution for comprehensive two-dimensional liquid chromatography (Agilent 1290 Infinity 二维液相色谱解决方案的全二维液相色谱性能评估)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-0138EN, **2012**

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2015
2015 年 2 月 1 日, 中国出版
5991-5521ZHCN



Agilent Technologies